ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

УДК 581.17 + 576.311.348.7 + 546.95 + 632.95.02

ВПЛИВ ЦИНКУ НА ОРГАНІЗАЦІЮ АКТИНОВИХ ФІЛАМЕНТІВ В КЛІТИНАХ КОРЕНІВ *ARABIDOPSIS THALIANA*

І. І. ГОРЮНОВА, молодший науковий співробітник*

А. І. ЄМЕЦЬ, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України

Державна Установа «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»

E-mail: innahoriunova.ukr.@gmail.com

Анотація*. Досліджено вплив одного з полютантів, мікроелементу - цинку (Zn^{2+}) - на прижиттєву організацію актинових філаментів (мікрофіламентів) різних типів клітин кореня Arabidopsis thaliana (L.) за допомогою лазерної скануючої мікроскопії. Для візуалізації мікрофіламентів була використана лінія Arabidopsis thaliana, яка експресує химерний ген gfp-fabd2. Встановлено, що Zn^{2+} дещо стимулює ріст головного кореня, а також не викликає змін в його морфології. Вперше показано, що Zn^{2+} в незначні мірі порушує організацію і орієнтацію мікрофіламентів в клітинах кореню, як основного органу рослин, який першим піддається інтоксикації ґрунтовими полютантами. Виявлено, що найбільш чутливими до його дії є актинові філаменти епідермальних клітин перехідної зони, а також клітини зони диференціації кореня A. thaliana*

Ключові слова: *клітини кореня, цитоскелет, актинові філаменти, актин, цинк, цитотоксичність*

Важкі метали є одними з найпоширеніших забруднювачів ґрунтів, відомих своїм токсичним впливом на живі організми. Внаслідок сильного антропогенного впливу, виникає проблема підвищеної акумуляції важких металів у рослинах, що негативно впливає, як на самі рослини, так і на людей і тварин, для яких рослини є невід`ємними частинами раціону. В зв`язку з цим важливо дослідити клітинні і молекулярні стрес-індуковані відповіді рослин на важкі метали, з подальшим виробленням ефективних стратегій боротьби з ними. До важких металів належать елементи з металічною структурою і густиною 3,5-7г/см^3, які декоруються дитизоном і проявляють широкий

*Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор Ємець Алла Іванівна

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

діапазон фітотоксичності (As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni, Se, Zn и др.) [6]. Т… деяких важких металів (Cd, Pb, Hg та ін.) у фізіологічних процесах рослин мало досліджена, інші – є невід`ємною частиною життєдіяльності рослин і виступають в ролі мікро- і ультрамікроелементів (Zn, Cu, Mg, Ni та ін.). В нашій роботі ми досліджували Zn^{2+}.

Zn^{2+} входить до складу більш, ніж 30 ферментів, зокрема, фосфатази, карбонангідрази, алкогольдегідрогенази, РНК-полімерази, а також активує енолазу, альдолазу, гексокіназу, триозофосфатдегідрогеназу, приймає участь в утворенні ауксину і хлорофілу, що демонструє роль Zn^{2+} в процесах дихання і фотосинтезу [15]. Також Zn^{2+} відіграє роль у формуванні рибосом, приєднується до фосфоліпідів і сульфгідрильних груп мембранних білків, впливає на проникність мембран [5], а також виступає одним із факторів регуляції транскрипції в сполуках, які містять залишки гістидину і цистеїну, т.к.н «цинкові пальці» [8]. Таким чином, ключовим фактором при реалізації фітотоксичності важких металів виступає концентрація. За гранично допустимих концентрацій Zn^{2+} корисний для життєдіяльності рослин, виступаючи в якості мікроелементу, а за перевищення фізіологічних концентрацій – проявляє токсичність.

Цитотоксичні властивості важких металів торкаються ряду фізіологічних процесів у рослин. Зокрема, за підвищеної концентрації Zn^{2+} в *Oryza sativa* L. відбувається уповільнення росту головних коренів і частковий некроз його клітин [17]; подібні процеси відбуваються і у вівсяниці червоної [12]. Однією з причин описаного явища є порушення проходження мітозу. Було продемонстровано, що в клітинах меристеми *Allium cepa* L. під впливом цинк-вмісного препарату Azzurro® спостерігаються *к*-мітози, формування хромосомних мостів, порушення проходження анафази, деполімеризація веретена поділу і фрагмопласту [2]. Крім негативного впливу на мітотичну активність клітин, важкі метали можуть уповільнювати пресинтетичний (G1) і постсинтетичний (G2) періоди клітинного циклу [10; 12]. Слід відмітити, що важкі метали, крім мутагенної та анеугенної дії, також здатні викликати

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

пошкодження ядра [11], порушувати синтез РНК та інгібувати активн рибонуклеаз [14]. В основі зазначених вище порушень клітинного поділу лежить насамперед здатність зв'язування іонів металів з сульфгідрильними групами білків веретена (зокрема, тубуліну), а також ферментів, які відповідають за проходження мітозу, внаслідок чого ці білки втрачають свою активність [11, 14]. Ще однією причиною подібного явища є взаємодія іонів металів з молекулою ДНК, в результаті чого зменшується стабільність її структури [19], а також безпосередній вплив на компоненти цитоскелету, зокрема на мікротрубочки і актинові філаменти (мікрофіламенти).

Вплив Zn^{2+} на мікрофіламенти, які в рослинній клітині беруть участь в клітинному поділі, рості, переміщенні і позиціюванні органел, транспорті везикул, регулюванні міжклітинних контактів крізь плазмодесми [9, 16] досліджено не було. Проте в опрацьованій нами літературі є дані, стосовно впливу інших важких металів на актинові філаменти рослинних клітин, що дає змогу припустити, про наявність такого впливу і для Zn^{2+}. Зокрема, за впливу Ni^{2+} и Cu^{2+} спостерігалась дозо- и часо- залежна реорієнтація і деполімеризація мікрофіламентів в культурі клітин водоростей *Spirogyra desmaina* [13]. Також відбувалось порушення організації актинових філаментів в кореневих волосках *Arabidopsis thaliana* (GFP-FABD2) після обробки Cd^{2+} [7].

В зв`язку з цим, **метою дослідження** було показати вплив Zn^{2+} на актинові філаменти різних типів клітин головних коренів *Arabidopsis thaliana.*

Матеріали і методи дослідження. Для досліджень нами були використані корені чотириденних проростків лінії *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (екотип Landsberg erecta (Ler.)), які експресують химерний ген *gfp-fabd2*, котрий дозволяє прижиттєво дослідити динаміку та організацію актинових філаментів, за допомогою візуалізації сигналу від зеленого флуоресцентного білка (GFP), злитого з білком, асоційованого з мікрофіламентами. Корені обрані нами в якості об'єкта досліджень, оскільки є універсальною моделлю у зв'язку з наявністю у своїй структурі різних типів клітин, які знаходяться на різних етапах розвитку, і відповідно, першими реагують на підвищення вмісту важких

металів в ґрунтах. Приготування поживних середовищ, пророщування насіння, обробка 4-денних проростків $ZnS0_4$ (Sigma-Aldrich, USA) в концентраціях 5-20 мкМ, а також дослідження морфології коренів і організації актинових філаментів в клітинах зони поділу, зон елонгації та диференціації *in vivo* за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Німеччина) проводили за методикою описаної нами раніше [1]. За допомогою програмного забезпечення версії 4SP2 LSM 510 META отримували тривимірні зображення організації мікротрубочок на основі серії оптичних зрізів (Z-стеків) з інтервалом 0,2-0,7 мкм. Дослідження повторювали 3-5 разів, вивчаючи не менше 10 проростків для кожної із зазначених концентрацій.

Результати досліджень та їх обговорення.

Вплив $ZnSO_4$ на ріст і морфологію головного корня Arabidopsis thaliana (GFP-FABD2). В результаті проведених досліджень показано, що вплив 5-10 мкМ $ZnSO_4$ викликав незначну стимуляцію росту головних коренів *A. thaliana* (GFP-FABD2) (Рис. 1). Зокрема, через 24 год приріст коренів збільшувався в 1,5 рази, а при обробці $ZnSO_4$ в концентрації 5 мкМ, в 1,5 рази, в 1,1 рази – при 10 мкМ і в 1,02 рази – при 20 мкМ. Разом з тим, обработка Zn^{2+} на протязі 48 і 72 год призводить до стимулювання росту в 1,3 и 1,02 рази (5 мкМ), в 1,22 і 0, 8 рази (10 мкМ) і в 1,3 и 1,2 рази (20 мкМ), відповідно (Рис.1)

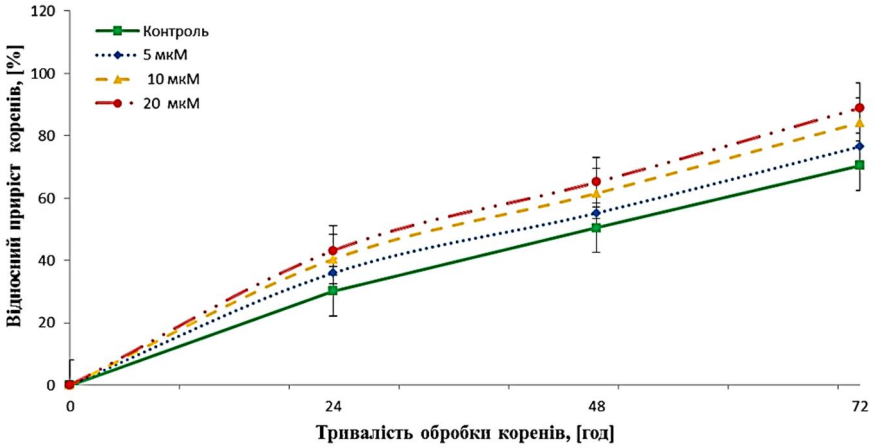

Рис.1. Вплив $ZnSO_4$ на ріст головних коренів *A. thaliana* (GFP-FABD2)

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

Морфологія головних коренів *A. thaliana* (GFP-FABD2) практично не була змінена, за впливу концентрацій 5-10 мкМ, лише за 20 мкМ спостерігалось незначне збільшення кореневих волосків (Рис.2, б-г). Для того, щоб продемонструвати життєздатність клітин коренів після впливу Zn^{2+}, була проведена детекція FDA, який є загально прийнятим маркером на живі клітини [28]. Наші результати демонструють збереження життєздатності усіх типів клітин коренів після обробки 5-20 мкМ Zn (Рис. 2, е-ж).

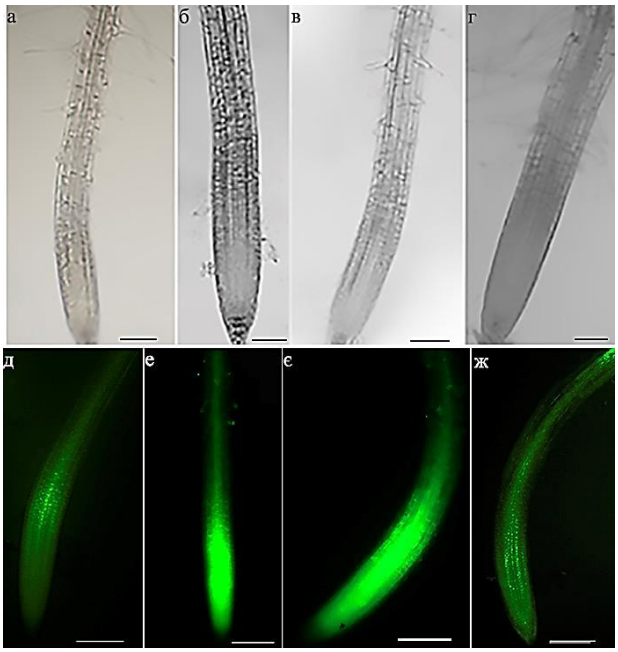

Рис. 2. Морфологія головних коренів проростків *A. thaliana* (GFP-FABD2), оброблених $ZnSO_4$ протягом 48 год: а,д – контроль; б, е – 5 мкМ; в, є – 10 мкМ, г,ж – 20 мкМ. Масштаб: а…ж – 200 мкм

Вплив $ZnSO_4$ на організацію актинових філаментів клітин головних коренів Arabidopsis thaliana (GFP-FABD2). Наступним етапом нашої роботі було дослідження впливу Zn^{2+} на просторову організацію і орієнтацію актинових філаментів в різних типах живих клітин коренів *A. thaliana*. Мікрофіламенти в інтерфазних клітинах апікальної меристеми необроблених коренів *A. thaliana* (GFP-FABD2) представляють собою тонку і високодинамічну сітчасту структуру, в епідермальних клітинах кореневого апексу, зон елонгації і

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

диференціації, а також в клітинах кортексу– подовжені, закручені товсті [illegible] тоді як в кореневих волосках вони мають поздовжню орієнтацію.

В епідермальних клітинах кореневого апексу після обробки на протязі 1 год 5 мкМ $ZnSO_4$ спостерігалось формування актинових філаментів, подібних до контролю, переважно з невпорядкованою орієнтацією (показано стрілками на Рис. 3, б), а за обробки 10-20 мкМ спостерігалось незначне порушення нативної організації мікрофіламентів (показано стрілками на Рис. 3, в-г).

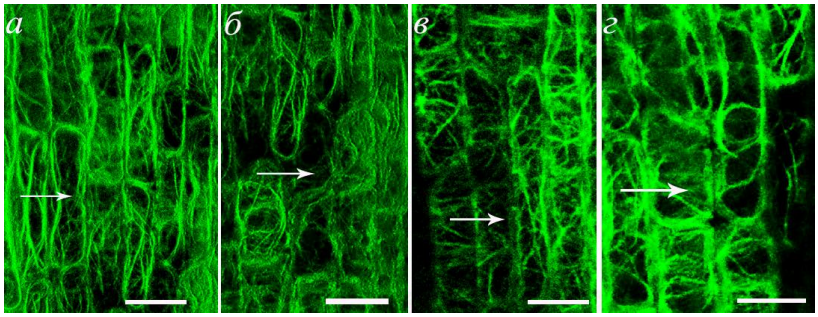

Рис. 3. Організація мікрофіламентів в епідермальних клітинах кореневого апексу коренів *A. thaliana* (GFP-FABD2) після обробки проростків $ZnSO_4$ протягом 1 год: а – контроль; б – 5 мкМ; в – 10 мкМ; г – 20 мкМ. Масштаб: 20 мкм.

В апікальній меристемі коренів, при обробці всіма досліджуваними концентраціями, актинові філаменти залишались інтактними (показано стрілками на Рис.4, б–г). Лише в деяких випадках, при обробці 10-20 мкМ спостерігали дещо порушену орієнтацію актинових філаментів.

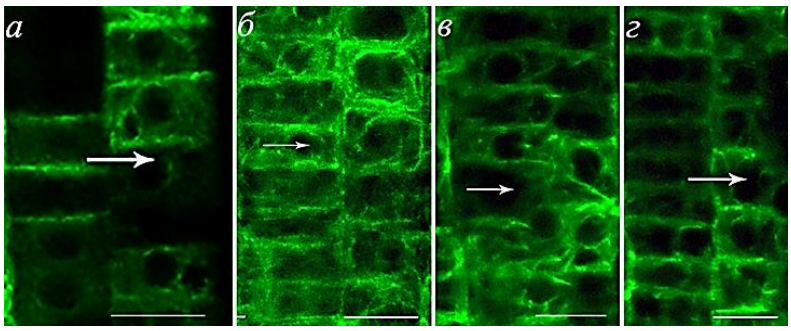

Рис. 4 Організація мікрофіламентів в клітинах апікальної меристеми коренів *A. thaliana* (GFP-FABD2) після обробки проростків $ZnSO_4$ протягом 1 год: а – контроль; б – 5 мкМ; в – 10 мкМ; г – 20 мкМ. Масштаб: 20 мкм

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

В клітинах перехідної зони вже після обробки 5 мкМ формувались бі… потовщені мікрофіламенти (показано стрілками на Рис. 5, б), але вже за 10-20 мкМ спостерігалась зміна орієнтації з невпорядкованої на частково повздовжню, а також незначна деполімеризація мікрофіламентів (показано стрілками на Рис. 5, в-г).

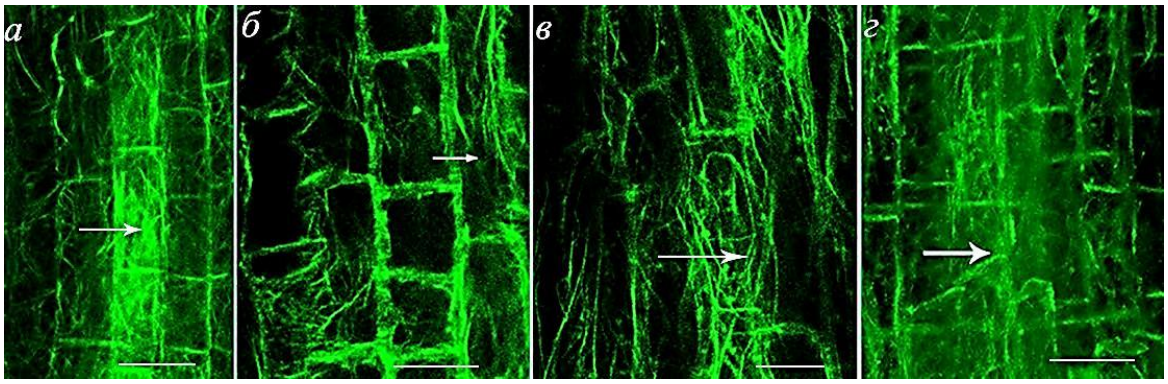

Рис. 5 Організація мікрофіламентів в епідермальних клітинах перехідної зони коренів *A. thaliana* (GFP-FABD2) після обробки проростків $ZnSO_4$ протягом 1 год: а – контроль; б – 5 мкМ; в – 10 мкМ; г – 20 мкМ. Масштаб: 20 мкм

В клітинах кортексу зони розтягу, в деяких з досліджуваних нами екземплярів, відбувалось незначне порушення типової орієнтації актинових філаментів, але загалом організація мікрофіламентів залишалась подібною до контролю. Навпаки, в трихобластах, атрихобластах і кореневих волосках спостерігалось формування мікрофіламентів з переважно поздовжньою орієнтацією (5мкМ), а також в деяких випадках – з частковою деполімеризацією (10-20 мкМ). Отже, наші спостереження демонструють актинові філаменти, як один з найчутливіших компонентів рослинної клітини до впливу різних абіотичних факторів, зокрема до важких металів. Таким чином, наші результати демонструють епідермальні клітини зони розтягу, а також трихобласти, атрихобласти і кореневі волоски, як мішені для впливу Zn^{2+}, тоді як глибинні шари коренів, зокрема клітини апікальної меристеми і клітини кортексу залишалися інтактними. Такий розподіл чутливості різних типів клітин, на нашу думку, пояснюється наявністю складних захисних

механізмів, які перешкоджають подальшому проникненню Zn^{2+}, в клітини кореня. Зокрема, в клітинах запускаються процеси накопичення важких металів в симпласті, зв'язування в клітинній стінці та/або ж інгібування ендоцитозу. Якщо концентрація важких металів дуже висока, відбувається синтез метал-хелатинів, а також накопичення їх в вакуолях, одночасно відбувається каскад реакцій оксидативного стресу, обумовлений посиленим синтезом стресових білків, сигнальних молекул і гормонів [6].

Подібні дані, в опрацьованій нами літературі, на рослинних клітинах знайдені не були. Загальний молекулярний механізм впливу важких металів, в тому числі і Zn^{2+} на мікрофіламенти залишається також мало дослідженим.

Одним з таких механізмів є надлишкове проходження важких металів по Ca^{2+}-каналам, оскільки Ca^{2+} , як і більшість важких металів є двовалентним, і мають схожі іонні радіуси, таким чином порушуючи градієнт Ca^{2+} в клітинах, заміщають його в Ca^{2+}-вмістних молекулах (наприклад, гельзоліні), надалі активуючи деполімеризацію актинових філаментів. [3]. Також було продемонстровано, властивості заміщати Mg^{2+} на інші двовалентні катіони важких металів, зокрема в процесі нуклеації актинових філаментів [4].

Існує припущення про здатність приєднання катіонів важких металів, до останнього атому С в молекулі актину [18]. Таким чином, механізми впливу важких металів на мікрофіламенти в рослинах потребують подальшого дослідження, що дозволить розробити ефективні стратегії захисту рослин від руйнівного впливу металів – забруднювачів ґрунтів.

Висновки

Zn^{2+} стимулює ріст головних коренів *A. thaliana*. і не викликає порушення морфології головних коренів.

Мішенню для впливу Zn^{2+} виявились мікрофіламенти епідермальних клітин зони елонгації і диференціації, тоді як актинові філаменти епідермальних клітин кореневого апексу і апікальної меристеми, а також клітин кортексу зони розтягу, залишилися інтактними, для всіх зазначених концентрацій.

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

Дослідження були виконані в рамках тематики ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» “Дослідження молекулярно-генетичних і клітинних механізмів стійкості рослин до абіотичних і біотичних факторів для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливих умов ”(2012-2016 г.г.)

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Горюнова И. И. Влияние кадмия на организацию актиновых филаментов в клетках корней *Arabidopsis thaliana* / [Горюнова И. И., Красиленко Ю. А., Заславский В. А., Емец А. И.] // Доп. НАН України. – 2014. - №9. – с. 127–134.

2. Andriolia N.B., Soloneskib S., Larramendyb M.L., Mudrya M.D. Cytogenetic and microtubule array effects of the zineb-containing commercial fungicide formulation Azzurro® on meristematic root cells of *Allium cepa* L. / Andriolia N.B., Soloneskib S., Larramendyb M.L., Mudrya M.D. // Mutat. Res. – 2012. -№ 742. – P. 48–53.

3. Apostolova, M.D. Involvement of gelsolin in cadmium-induced disruption of the mesangial cell cytoskeleton / Apostolova, M.D., Christova, T., Templeton, D.M. // J. Toxicol. Sci. – 2006. – Vol. 89, № 2. – P.465–474.

4. DalleDonne I. Actin assembly by cadmium ions / DalleDonne, I.; Milzani, A.; Colombo, R. // Biochim. Biophys. Acta. – 1997. – № 357. – P. 5–17.

5. Dang H.R. Absorption, accumulation and distribution of zinc in highly-yielding winter wheat / Dang H.R., Li Y., Sun X., Zhang Y. // Agr. Sci. China. – 2010. – Vol. 9 №7. – P.965–973.

6. Duffus J.H. “Heavy Metals”—a meaningless term? / Duffus, J.H. // Pure Appl. Chem. – 2002. – Vol. 74, № 5. P. – 793–807.

7. Fan J.-L. Disarrangement of actin filaments and Ca^{2+} gradient by $CdCl_2$ alters cell wall construction in *Arabidopsis thaliana* root hairs by inhibiting vesicular trafficking / Fan J.-L. , Wei X.-G. , Wan L.-C., Zhang L.-Y. , Zhao X.-Q. , Liu W.-Z. , Hao H.-Q., Zhang H.-Y. // J. Plant Physiol. – 2011. – № 168. – P. 1157–1167.

8. Gupta S.K. Comparative analysis of zinc finger proteins involved in plant disease resistance / Gupta S.K., Rai, A.K., Kanwar S.S.,

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com
ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

Sharma T. R. // PLoS ONE. – Vol. 7 . http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0042578

9. Henty-Ridilla J. L. Actin dynamics in the cortical array of plant cells / Henty-Ridilla J.L., J. Li, Blanchoin L., Staiger C.J. // Current Opinion in Plant Biology. – 2013. – №16. – P.678–687.

10. Liso R. Responship between ascorbic acid and cell division / Liso R., Calabrese G., Bintoni M.B., Arrigoni O . // Exp. Cell Res. – 1984. – Vol. 150. – P. 314–320.

11. Liu D. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic / Liu D., Jiang W., Gao X. // Biol. Plant. – 2003/4. – № 47. – P. 79–83.Powell M.J., Davies M.S., Francis D. The influence of zinc on the cell cycle in the root meristem of a zinc-tolerant and a non-tolerant cultivar of *Festuca rubra* L. / Powell M.J., Davies M.S., Francis D. // New Phytol. – 1986. – Vol.102. – P. 419–428.

12. Pribyl P., Cepák V., Zachleder V. Cytoskeletal alterations in interphase cells of the green alga *Spirogyra decimina* in response to heavy metals exposure: I. The effect of cadmium / Pribyl P., Cepák V., Zachleder V. // Protoplasma. – 2005. – № 226. – P. 231–240.

13. Shah K. Cadmium elevates level of protein, amino acids and alters activity of proteolytic enzymes in germinating rice seeds / Shah K., Dubey R.S. // Acta Physiol. Plant. – 1998. – Vol. 20, № 2. – P. 189–196.

14. Sinclair S.A. The zinc homeostasis network of land plants / Sinclair S.A., Krämer U. // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012. – № 1823. – P.1553–1567.

15. Staiger C.J. Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the *Arabidopsis* cortical array / Staiger C.J., Sheahan M.B., Khurana P., Wang X., McCurdy D.W. // J. Cell Biol. – 2009. – Vol. 184 № 2. – P. 269–280.

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

16. Street R. A. Toxicity of metal elements on germination and seed[illegible] growth of widely used medicinal plants belonging to *Hyacinthaceae* / Street R. A., Kulkarni M.G., Stirk W. A., Southway C., Van Staden J // Bull. Environ. Contam Toxicol. – 2007. – Vol.79, №4. – P. 371–376.

17. Tang, J.X. The polyelectrolyte nature of F-actin and the mechanism of actin-bundle formation / Tang J.X., Janmey P.A. // JBC. – 1996. – № 271. – P.8556–8563.

18. Wierzbicka M. Resumption of mitotic activity in *Allium* cepa root tips during treatment with lead salts / Wierzbicka M. // Environ. Exp. Bot. – 1994. – Vol. 34. –P. 173–180.

ВЛИЯНИЕ ЦИНКА НА ОРГАНИЗАЦИЮ АКТИНОВИХ ФИЛАМЕНТОВ В КЛЕТКАХ КОРНЕЙ *ARABIDOPSIS THALIANA*

И. И. Горюнова, А. И. Емец

Аннотация. *Исследовано влияние одного из полютантов, микроэлемента – цинка (Zn^{2+}) - на прижизненную организацию актиновых филаментов (микрофиламентов) разних типов клеток корня Arabidopsis thaliana (L.) с помощью лазерной сканирующей микроскопии. Для визуализации микрофиламентов была использована линия Arabidopsis thaliana, экспресирующая химерный ген gfp-fabd2. Встановлено, что Zn^{2+} имеет в незначительной мере стимулирующие влияние на рост главних корней, а также не вызывает изменений в их морфологии. Впервые показано, что Zn^{2+} в изменяет организацию и ориентацию в клетках корня, як основного органа растений, который первым поддается интоксикации почвенными поллютантами. Показано, что наиболее чувствительными к его действию являются актиновые филаменты эпидермальных клеток переходной зоны, а также клетки зоны дифференциации кореня A. thaliana.*

Ключевые слова: *клетки корня, цитоскелет, актиновые филаменты, актин, цинк, цитотоксичность*

EFFECT OF ZINC ON ACTIN FILAMENTS ORGANIZATION IN *ARABIDOPSIS THALIANA* PRIMARY ROOT CELLS

I. I. Horiunova, A. I. Yemets

Abstract. *The influence of one of the most toxic heavy metals - zinc (Zn^{2+}) - actin organization in vivo filaments (microfilaments) different types of Arabidopsis thaliana (L.) root cells using laser scanning microscopy. To visualize microfilaments was used Arabidopsis thaliana (L.) line, expressed chimeric gene GFP-FABD2. Established:*

ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com
ABBYY PDF Transformer 2.0 Click here to buy www.ABBYY.com

Ni^{2+} leads to a significant inhibition of growth the main root, and gives his morpho[illegible] causing swelling epidermal cells and inducing a large number of abnormally long root hairs. For the first time shown that Zn^{2+} gives guidance and organization of actin filaments in cells, leading to morphological changes of root plants as the main body, the first intoxication exposed soil pollutants. Found that the most sensitive to its action is actin filaments epidermal cells of root growth zones A. thaliana.

Keywords: *root cells, the cytoskeleton, actin filaments, actin, zinc, cytotoxicity*